

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **63-048213**

(43)Date of publication of application : **29.02.1988**

(51)Int.Cl.

A61K 31/35  
C07D493/10

(21)Application number : **61-190575**

(71)Applicant : **IDEMITSU KOSAN CO LTD**

(22)Date of filing : **15.08.1986**

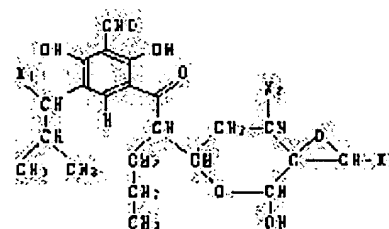
(72)Inventor : **SUZUKI GENSHI  
KADOTA AKIHIKO  
TSUZUKI MORIYUKI**

## (54) ANTITUMOR AGENT

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide an antitumor agent containing an SI-4228 substance as an active component, capable of suppressing the growth of cancer cell even at a low concentration and free from cytotoxicity to normal lymphocyte.

**CONSTITUTION:** The objective antitumor agent contains, as an active component, an SI-4228 substance of formula (X1 is H or methoxy; X2 is H or OH; X3 is methyl, ethyl, propyl or isopropyl) separated from the cultured product produced by culturing a microbial strain belonging to Streptomyces genus [e.g. Streptomyces sp. SI-4228 (FERM P-6198)] under aerobic condition at 25W34°C for 3W10 days. Examples of the compound of formula are SI-4228A (X1 is methoxy, X2 is OH and X3 is methyl), SI-4228C (X1 and X2 are H and X3 is methyl), etc. The dose of the compound is 5W1,000mg, preferably 10W300mg daily for adult patient.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

## ⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-48213

⑫ Int. Cl. 1

A 61 K 31/35  
C 07 D 493/10

識別記号

ADU

庁内整理番号

7330-4C  
C-8615-4C

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月29日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑮ 特 願 昭61-190575

⑯ 出 願 昭61(1986)8月15日

⑰ 発 明 者 鈴 木 源 士 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地  
 ⑱ 発 明 者 門 田 明 彦 千葉県市原市山田橋766番地1号  
 ⑲ 発 明 者 都 築 司 幸 東京都世田谷区船橋3丁目21番8号  
 ⑳ 出 願 人 出光興産株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号  
 ㉑ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

## 明 細 書

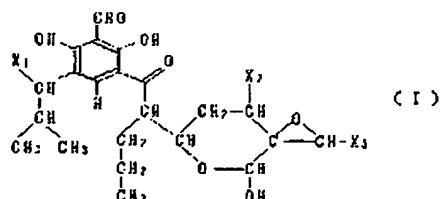
環己基の抗腫瘍剤。

## 1. 発明の名称

抗腫瘍剤

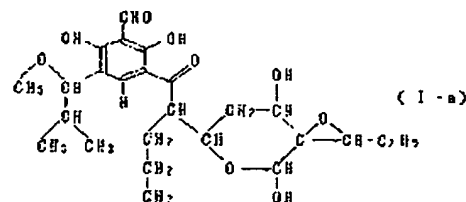
## 2. 特許請求の範囲

(1) 一般式 (I) で表わされる SI-4228 系物質を  
有効成分として含有する抗腫瘍剤。

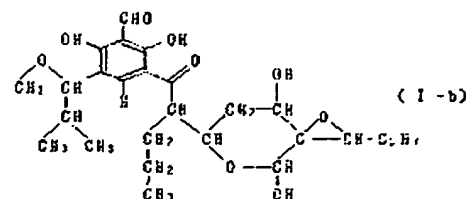


(ここで、X<sub>1</sub>は水素原子またはメチル基を、X<sub>2</sub>は水素原子または水酸基を、X<sub>3</sub>はメチル基、エチル基、プロピル基またはイソプロピル基を示す。)

(2) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-a) で表わされる SI-4228A 物質である特許請求の範囲第1



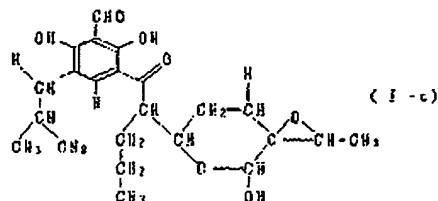
(3) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-b) で表わされる SI-4228B 物質である特許請求の範囲第1  
環己基の抗腫瘍剤。



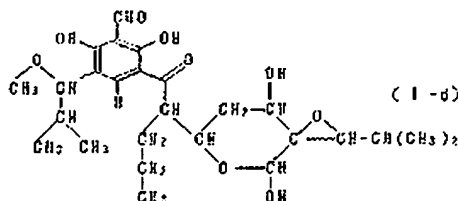
(4) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-c) で表わ

特開昭63-48213(2)

される SI-4226C 物質である特許請求の範囲第 1 項記載の抗腫瘍剤。



(5) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-d) で表わされる SI-4228D 物質である特許請求の範囲第 1 項記載の抗腫瘍剤。



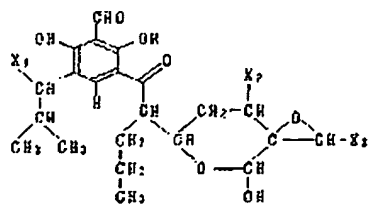
3

且出している (特開昭58-118686 号)。

【問題点を解決するための手段】

本発明者は、さらに研究を進めた結果、上記従来物質はさらに 3 種類の構造類似の新規物質を生産することを見出すと共に、これら物質が抗腫瘍作用を有していることを知見して本発明を完成するに至った。

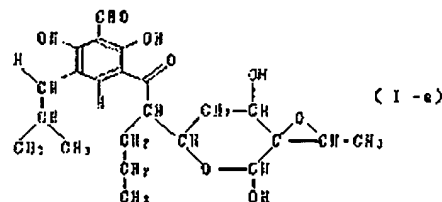
すなわち本発明は、一般式 (I) で表わされる SI-4228 系物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤に関するものである。



(ここで、X<sub>1</sub>は水素原子またはメトキシ基を、X<sub>2</sub>は水素原子または水酸基を、X<sub>3</sub>はメチル基、エチ

5

(8) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-e) で表わされる SI-4228E 物質である特許請求の範囲第 1 項記載の抗腫瘍剤。



### 3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は SI-4228 系物質を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

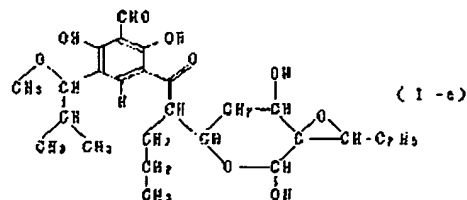
【従来の技術】

本発明者は既にストレプトミセス系に属する糖生物、ストレプトミセス・エスピー-SI-4228 (FERM P-8188) が新規物質を生産することならびに該物質が腫瘍用殺菌剤として有用であることを

4

ル基、プロピル基またはインプロピル基を示す。)

上記式 (I) において、X<sub>1</sub>がメトキシ基、X<sub>2</sub>が水酸基、X<sub>3</sub>がエチル基である物質、すなわち下記の式 (I-e) で表わされる物質を SI-4228A 物質と称し、本物質の化合物名は 2-ニチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]-5-ジオキサスピロ (2,6)オクタンである。本物質の理化学的性質は特開昭58-118686 号に記載されている。

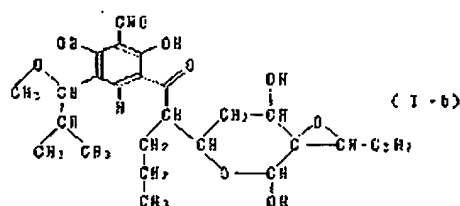


また上記式 (I) において、X<sub>1</sub>がメトキシ基、

6

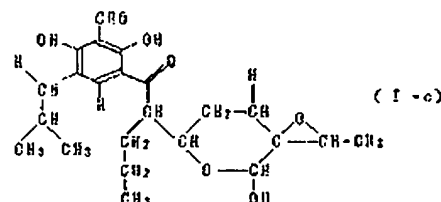
特開昭63-48213(B)

$X_1$ が水酸基、 $X_2$ がプロピル基である物質、すなわち下記の式(1-b)で表わされる物質をSI-4228B物質と称し、本物質の化合物名は2-プロピル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。本物質の理化学的性質は特開昭59-82087号に記載されている。



前記式(1)において、 $X_1$ と $X_2$ が水素原子であり、 $X_3$ がメチル基である物質、すなわち下記の式(1-c)で表わされる物質をSI-4228C物質と称

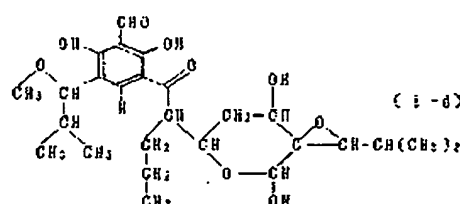
し、本物質の化合物名は2-メチル-4-ヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。



また前記式(1)において、 $X_1$ がメトキシ基、 $X_2$ が水酸基であり、 $X_3$ がプロピル基である物質、すなわち下記の式(1-d)で表わされる物質をSI-4228D物質と称し、本物質の化合物名は2-プロピル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]

7

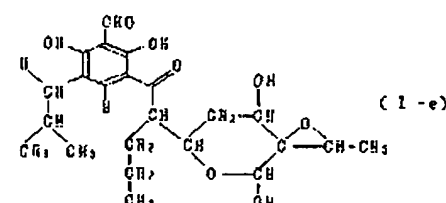
-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。



前記式(1)において、 $X_1$ が水素原子、 $X_2$ が水酸基であり、 $X_3$ がメチル基である物質、すなわち下記の式(1-e)で表わされる物質をSI-4228E物質と称し、本物質の化合物名は2-メチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。

9

8



これらSI-4228C物質、同D物質および同E物質の理化学的性質は特開昭61-184575号明細書に記載されている。

本発明に用いるSI-4228系物質はいずれもストレプトミセス属に属する微生物、たとえばストレプトミセス・エスピーSI-4228株(FERM P-8188)を培養し、培養物から該物質を採取することによって得ることができる。

培養は該微生物が利用できる炭素物を含有する培地を用いて行ない、たとえば炭源としてグルコース、シュクロース、デンプン、水アメ、デキストリン、グリセリンなどを使用できる。また、窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アン

10

## 特開昭63-48213(4)

モニウム、肉エキス、コーン・ステアーブ・リカー、ペプトン、乾酵母、コーン・グルテン、大豆粉その組の有糖または無糖の窒素化合物などを使用することができる。その他必要に応じて食塩、リン酸塩類、カルシウム、亜鉛、マグネシウム、鉄などの無機塩類を添加したり、微生物の生育を助け、SI-4228系物質の生産に有用な物質を適宜添加することができる。

培養は好気的条件下に行なわれ、通常は25～34℃、好ましくは28～32℃の温度で3～10日間、好ましくは4～6日間行なうことによってSI-4228系物質の蓄積量が最高となる。SI-4228系物質は培養液内に蓄積される他、菌体内にも蓄積される。

本発明のSI-4228系物質は前記した理化学的性質を有するので、賦性質を考慮して抽出、精製を行なう。すなわち、培養液に①酢酸エチル等の有機溶剤を加えて抽出を行ない、得られた抽出液を適当な手段によって濃縮後、ベンゼンを用いて洗浄する。次いで、ゲル透過を行ない、シリカゲル

カラムで分離、精製する②培養物の残渣をイオン交換樹脂または活性炭吸着に付し、次いで抽出を行なった後、前述の細くシリカゲルカラムで分離精製し、さらにゲル透過を行なってから結晶化せしめる等の方法により精製されたSI-4228系物質を得ることができる。

これらSI-4228系物質についてポテト・ゲルコース寒天培地を用い倍希釈法により求めた各種微生物に対する最小抑菌阻止濃度は、SI-4228A物質は特開昭56-118686号に、SI-4228B物質は特開昭58-62087号に、SI-4228C物質、同D物質および同E物質は特開昭61-164575号明細書にそれぞれ記載されている。

SI-4228系物質を抗腫瘍剤として使用するときの投与量は患者の症状、年齢、体重、投与方法等により異なるが、一般に成人患者に対する1日の投与量は5～1000mg、好ましくは10～300mgである。

SI-4228系物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤の投与形態は経口剤、注射剤、坐剤、注腸剤

11

などのいずれでもよい。

## 【発明の効果】

本発明に係るSI-4228系物質は抗腫瘍作用を有しており、特に癌細胞に対して低濃度で用い、その増殖を抑えることができる。しかも、正常のリンパ細胞に対しては細胞障害が認められない。したがって、SI-4228系物質は抗腫瘍剤として有用である。

## 【実施例】

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。実施例1～5および参考例

## ヒト癌細胞に対するin vitroテスト

ヒト癌に対する有効性を、ヒト癌培養細胞を用いて検討した。供試細胞はEB-3 (American Type Culture CollectionのCCL-35株細胞、大日本製薬株式会社より購入)で、RPMI 1640培地(ザブコ・ラボラトリー製)に10%牛胎児血清を添加し、継代培養したものを使用した。また、比較細胞として成人末梢血より分離したリンパ細胞【免疫実験操作法(4) - 日本免疫学会編、(1973) 443～446頁】

13

12

を使用した。

癌細胞およびリンパ細胞を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地に浮遊し(5×10<sup>5</sup>個/2)、5%炭酸ガス、95%空気、湿度100%、37℃の環境下で培養した。

SI-4228A～E物質は、それぞれエタノールに溶解し、癌細胞およびリンパ細胞の培養初日に添加した。培地中のSI-4228A～E物質の最終濃度は100μg/ml、エタノール濃度0.5 vol.%に調整した。また、SI-4228A～E物質を添加しない群においてはエタノールのみを添加した。

癌細胞に対する有効性はトリパンブルーを用いるdye-exclusion法で顕微鏡下にトリパンブルーに染色る細胞を計測し、細胞の生存率を求めることにより評価を行った。なお、トリパンブルーによる細胞生存率の測定は培養1日目、2日目、3日目に行った。結果を第1表に示す。



14

特開昭63-48213(5)

第 1 表

|       | 実 験 群<br>(添加濃度, $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | テ ス ト 細 胞  | 生 存 率 (%) |     |     |
|-------|---|------------|-----------|-----|-----|
|       |   |            | 1日目       | 2日目 | 3日目 |
| 参 考 例 | 無 添 加                                     | 0 リンパ細胞    | 98        | 88  | 88  |
|       | SI-4228A                                  | 100 "      | 99        | 87  | 97  |
|       | 無 添 加                                     | 0 EB-3細胞   | 98        | 88  | 87  |
| 実施例 1 | SI-4228A物質                                | 100 EB-3細胞 | 18        | 4   | 0   |
| " 2   | " B-                                      | 100 "      | 88        | 5   | 0   |
| " 3   | " C-                                      | 100 "      | 28        | 4   | 0   |
| " 4   | " D-                                      | 100 "      | 23        | 4   | 0   |
| " 5   | " E-                                      | 100 "      | 50        | 6   | 0   |

表から明らかなように、SI-4228系物質は正常のリンパ細胞に対しては細胞障害性を認めないが、癌細胞EB-3に対しては強い細胞障害性を示した。

実施例 6 ~ 10

特開昭58-116686号の実施例2と同様の方法により SI-4228A物質を製造した。また、特開昭

58-82087号の実施例2と同様の方法にて SI-4228B物質を製造した。さらに、特開昭61-184575号の製造例1, 2の方法により SI-4228C, D, E物質を製造した。

これらの方法で製造したSI-4228系物質を用いて、EB細胞に対する増殖阻害効果を調べた。

イーグルズミニマルエッセンシャル培地(MEM)に10%の仔牛血清を加えた培地にKB細胞を $2 \times 10^4$ 個/皿に希釈した液3mlを結晶炭酸ガスインキュベーター内(5%炭酸ガス, 37°C)で24時間培養した。次いで、SI-4228A, B, C, D, Eの各物質を1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、さらに3日間炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

その後、トリプシンを用いて細胞を培養容器からはがし、細胞数をコールターカウンターで計測し、SI-4228系物質を全く加えていないコントロールの細胞数に対し50%の増殖阻害を示す濃度(ED<sub>50</sub>)を計算により求めた。結果を第2表に示す。

1 5

1 6

第 2 表

|       | 物 質        | ED <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|-------|------------|--|
| 実施例 6 | SI-4228A物質 | 1.4  |
| " 7   | SI-4228B物質 | 1.7  |
| " 8   | SI-4228C物質 | 2.4  |
| " 9   | SI-4228D物質 | 2.1  |
| " 10  | SI-4228E物質 | 2.8  |

表から明らかなように、本発明のSI-4228系物質はいずれも低濃度で細胞の増殖を抑制した。

特許出願人 出 光 興 産 株 式 会 社

代 理 人 弁 理 士 久 保 田 藤 郎

1 7